



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



⑪ Veröffentlichungsnummer: **0 471 701 B1**

⑫

## EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT

⑯ Veröffentlichungstag der Patentschrift: **19.10.94** ⑯ Int. Cl. 5: **C07K 15/14, A61K 35/12**

⑯ Anmeldenummer: **90906924.7**

⑯ Anmeldetag: **04.05.90**

⑯ Internationale Anmeldenummer:  
**PCT/EP90/00719**

⑯ Internationale Veröffentlichungsnummer:  
**WO 90/13575 (15.11.90 90/26)**

### ⑯ NEUE PROTEINE MIT TNF-HEMMENDER WIRKUNG UND IHRE HERSTELLUNG.

⑯ Priorität: **09.05.89 DE 3915072**  
**05.07.89 DE 3922089**

⑯ Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
**26.02.92 Patentblatt 92/09**

⑯ Bekanntmachung des Hinweises auf die  
Patenterteilung:  
**19.10.94 Patentblatt 94/42**

⑯ Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE ES FR GB IT LI NL SE**

⑯ Entgegenhaltungen:  
**EP-A- 0 308 378**

Chemical Abstracts, Band 108, No. 23, 6  
June 1988, (Columbus, Ohio, USA), P Secklinger et al. Page 525, Zusammenfassung  
203006c

Chemical Abstracts, Band 110, No. 15, 10  
April 1989 (Columbus, Ohio USA), C Peetre et al. Seite 553, Zusammenfassung 133375n

⑯ Patentinhaber: **BASF Aktiengesellschaft**  
**Carl-Bosch-Strasse 38**  
**D-67063 Ludwigshafen (DE)**

⑯ Erfinder: **LEMAIRE, Hans-Georg**  
**Flomersheimer Eck 7**  
**D-6716 Dirmstein (DE)**  
Erfinder: **HILLEN, Heinz**  
**Max-Planck-Strasse 17**  
**D-6733 Hassloch (DE)**  
Erfinder: **MOELLER, Achim**  
**3 Carriage Lane**  
**Winchester, MA 01890 (US)**  
Erfinder: **DAUM, Lothar**  
**Reiherstrasse 25**  
**D-6701 Otterstadt (DE)**  
Erfinder: **DOERPER, Thomas**  
**Luitpoldstrasse 3**  
**D-6719 Bissersheim (DE)**  
Erfinder: **SUBKOWSKI, Thomas**  
**Ruchheimer Strasse 1**  
**D-6704 Mutterstadt (DE)**

**EP 0 471 701 B1**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingeleitet, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

**Chemical Abstracts, Band 110, No. 23, 5 Juni 1989, (Columbus, Ohio, USA), I Olsson et al. Siehe Seite 557, Zusammenfassung 210604r**

**The Journal of Biological Chemistry, Band 264, No. 20, 15 Juli 1989, American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc., (US), P Seckinger et al. Seiten 11966-11973**

**The Journal of Biological Chemistry, Band 264, No. 20, 15 Juli 1989, American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc., (US), H Engelmann et al. Seiten 11974-11980**

**The Journal of Biological Chemistry, Band 265, No. 3, 25 Januar 1990, American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc., (US), H Engelmann et al. Seiten 1531-1536**

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Proteine und deren Herstellung.

TNF $\alpha$  (Tumor-Nekrose-Faktor) ist ein bekanntes Protein, welches ein breites Spektrum an biologischen Aktivitäten besitzt. Er beeinflußt verschiedene maligne und nicht-maligne Zelltypen, spielt eine Rolle bei septischem Schock und Gewebeverletzungen sowie Nierenabstößungen, Transplantationen, Schocklunge und zerebraler Malaria (Lympkines 1987 Vol. 14; Pharmaceutical Res. 5, 129 (1988); Science 234, 470 (1986); Nature 330, 662 (1987); J. Exp. Med. 166, 1132 (1987); Science 237, 1210 (1987); J. Exp. Med. 166, 1280 (1987)).

Es ist bekannt, daß man die Wirkung von TNF $\alpha$  mit Antikörpern neutralisieren kann (EP 260 610). Diese Antikörper sind jedoch nicht humane Substanzen, so daß sie bei der Anwendung am Menschen Immunreaktionen auslösen können.

Es wurden nun Proteine gefunden, die humangen Ursprungs sind und die Wirkung von TNF $\alpha$  neutralisieren können.

Gegenstand der Erfindung sind Proteine, welche in ihrer ursprünglich glykosylierten Form ein Molekulargewicht von etwa 42.000 Dalton besitzen und am N-Terminus die Aminosäuresequenzen Xaa Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu aufweisen, worin X ein Wasserstoffatom, einen Phenylalaninrest (Phe) oder die Aminosäuresequenzen Ala Phe, Val Ala Phe, Gln Val Ala Phe, Ala Gln Val Ala Phe, Pro Ala Gln Val Ala Phe oder Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe darstellt, und deren Mutante.

Als Mutante sind Proteine zu verstehen, die durch geeigneten Austausch, Deletion oder Addition von Aminosäuren oder Peptiden in der Proteinkette entstehen, ohne daß dadurch die Wirkung der neuen Proteine stark nachläßt. Die Mutante können auch durch Variation des Glykosidrestes erhalten werden.

Die hier beschriebenen neuen Proteine besitzen saure Eigenschaften, ihr isoelektrischer Punkt liegt bei pH 2 bis 5. Sie binden sich spezifisch an TNF $\alpha$  und sind durch Trypsin schwer oder gar nicht verdaubar.

Die neuen Proteine lassen sich beispielsweise aus dem Harn von Patienten isolieren, die Fieber haben, d.h. deren Körpertemperatur etwa 38°C oder höher ist. Hierzu wird der Harn zunächst konzentriert, was beispielsweise durch Umkehrsmose oder Ultrafiltration geschehen kann. Das dadurch erhaltene Retentat wird anschließend durch Ionenaustausch- und Affinitätschromatographie gereinigt.

Die Proteine lassen sich auch aus menschlicher Ascites-Flüssigkeit von Patienten mit Ovarial-

carcinomen gewinnen.

Die Reinigung der Proteine kann nach bekannten Methoden, wie Affinitäts- oder Ionenaustauschchromatographie, erfolgen.

- 5 Die so gewonnenen Proteine sind am N-Terminus in der Aminosäuresequenz inhomogen. Es können bis zu 7 Aminosäuren fehlen. Solche Inhomogenitäten sind bei körpereigenen Proteinen nicht ungewöhnlich und treten beispielsweise auch beim  $\gamma$ -Interferon auf.
- 10 Durch Behandlung mit einer Endoglykosidase verändert das Protein sein Laufverhalten in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese, was auf die Abspaltung von Zuckerresten zurückzuführen ist.
- 15 Die hier beschriebenen Proteine liegen im Urin und in der Ascitesflüssigkeit in Konzentrationen zwischen 1 - 100  $\mu$ g/l vor. Um das Protein für pharmazeutische Zwecke in größeren Mengen verfügbar zu machen, kann man bekannte gentechnische Methoden (vgl. Maniatis, T. et al: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y., 1982) heranziehen. Für diesen Zweck muß zunächst die genetische Information für das neue Protein identifiziert und die entsprechende Nukleinsäure isoliert werden. Dazu wird das reine Protein mit Dithiothreitol reduziert, dann wird Iodacetamid zur Derivatisierung der freien SH-Gruppen zugesetzt und anschließend wird das so behandelte Protein mit Bromcyan und anschließend mit Trypsin in kleine Peptide gespalten. Die Auf trennung der Peptide erfolgt über reversed phase-Chromatographie. Die N-terminale Sequenzierung eines dieser gereinigten Peptide ergab die Sequenz Val Phe Cys Thr Lys. Weiter enthält das Protein folgende drei weitere Peptidsequenzen: Gly Val Tyr Thr Ser, Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Tyr und Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Xab Thr Thr Ser Asp Ile Cys Arg Pro, worin Xab eine noch unbekannte Aminosäure ist, die möglicherweise glykosyliert ist.
- 20 Die vorhandenen Peptidsequenzen erlauben nun durch die Synthese entsprechende Oligonukleotide eine eindeutige Identifizierung des Gens aus dem menschlichen Genom oder aus entsprechenden c-DNA-Bänken durch sequenzspezifische Filterhybridisierung.
- 25 Die so erhaltene genetische Information für das Protein kann dann in verschiedene Wirtszellen, wie eukaryontische Zellen, Hefen, *Bacillus subtilis* oder *E. coli* nach bekannten Methoden zur Expression gebracht und das Protein so erhalten werden. In den eukaryotischen Zellen entsteht dabei das Protein in glykosylierter Form.
- 30 Die Mutante, die sich durch Austausch, Deletion oder Addition von Aminosäuren oder Peptiden von den neuen Proteinen ableiten, werden vorzugsweise nach gentechnischen Methoden dargestellt.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55

Die neuen Proteine zeigen gute TNF $\alpha$ -inhibierende Wirkungen und lassen sich daher zur Behandlung von Krankheiten einsetzen, bei denen die Konzentration an TNF $\alpha$  in Körperflüssigkeiten erhöht ist, wie z.B. bei septischem Schock. Weiter können sie bei folgenden Erkrankungen angewendet werden: Allergien, Autoimmunkrankheiten, Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, Schocklunge, entzündliche Knochenerkrankungen, Blutgerinnungsstörungen, Verbrennungen sowie bei Komplikationen nach Transplantationen.

#### Beispiel 1

##### Bestimmung der TNF $\alpha$ -inhibitorischen Wirkung

Die biologische Aktivität von TNF $\alpha$  wurde durch Lyse der Mauszelllinie L929 (J. Biol. Chem. 260, 2345 (1985) und der Humanzelllinie MCF7 bestimmt. Bei Versuchen zur Bestimmung der TNF $\alpha$  inhibitorischen Wirkung wurde eine Konzentration an TNF $\alpha$  gewählt, bei der mindestens 50 % der Zellen lysierten.

Überstände mit TNF $\alpha$  bindenden Proteinen wurden in 1:2 Schritten in Mikrotiterplatten verdünnt. Zu dieser Lösung (0,05 ml) wurden je 0,05 ml Human- bzw. Maus-TNF $\alpha$  (120 pg/ml) gegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50.000 L929-Zellen in 0,1 ml Medium, das 2  $\mu$ g/ml Actinomycin D enthielt. Nach einer Inkubationszeit von 20-24 h bei 37 °C im Brutschrank wurden die Zellen fixiert und mit Kristallviolett gefärbt. In Abwesenheit von TNF $\alpha$ -bindendem Protein lysierten TNF $\alpha$  und LT (Lymphotoxin) die Zellen. Diese wurden während der Färbung abgeschwemmt. Der schützende Effekt von Überständen mit TNF $\alpha$ -bindenden Proteinen zeigte sich durch die Färbbarkeit von intakten Zellen, die zurückblieben.

Eine Inhibition der cytotoxischen Wirkung war sowohl gegenüber Human-TNF $\alpha$ , als auch etwas schwächer gegenüber Human-LT zu beobachten, nicht jedoch bei Maus-TNF $\alpha$ .

#### Beispiel 2

##### Proteinisolierung aus Urin

40 l Sammelurin von Patienten mit Fieber ( $\geq 38^{\circ}\text{C}$ ) wurde über eine Hemoflow® F60 Patrone (Fa. Fresenius) filtriert, bis das Volumen des Retentatstromes auf 2,5 l aufkonzentriert war.

Das Retentat wurde anschließend zum Waschen 4 mal mit je 2,5 l 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 4,0 versetzt und die Filtration jeweils bis zum Ausgangsvolumen von 2,5 l fortgesetzt.

Das so erhaltene proteinreiche, braun gefärbte Retentat wurde über S-Sepharose® der Fa. Pharmacia (Säule:  $\varnothing = 5$  cm,  $l = 17$  cm) chromatogra-

phiert. Die Säule wurde vor Beginn des Auftrages mit 10 Säulenvolumina (SV) 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 5,5 (= Puffer I) äquilibriert und das Retentat aufgetragen. Es wurde mit 3 SV Puffer I nachgewaschen und das Wertprodukt durch Elution mit 3 SV eines 20 mM Natriumphosphatpuffers pH 6,5 (Puffer II) gewonnen.

Zur weiteren Reinigung wurde diese Fraktion über eine TNF-Affinitätsäule (Beispiel 4) gegeben ( $\varnothing = 1,5$  cm,  $l = 10$  cm), die mit 10 SV Puffer III (20 mM Natriumphosphat, 140 mM NaCl, pH 7,2) aquilibriert worden war. Nach dem Auftrag wurde mit 3 SV Puffer III nachgewaschen und die TNF-bindende Proteinfraktion durch Elution der Säule mit 40 ml eines Puffers IV, bestehend aus 0,58 % Essigsäure und 140 mM NaCl, gewaschen.

Zur Isolierung des reinen Proteins wurde das Eluat der TNF-Affinitätsäule über eine Mono Q-Säule HR 5/5 der Fa. Pharmacia aufgetrennt. Dazu wurde zunächst das Eluat mit 0,1 n NaOH auf pH 12,0 eingestellt.

Die Säule wurde mit 11 SV 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 12,0 (Puffer V) äquilibriert. 10 ml des pH-adjustierten TNF-Affinitätsäuleneluates wurde aufgetragen und mit 4,4 SV Puffer V gewaschen. Anschließend wurde mit 20 mM Natriumphosphat pH 7,5, eluiert.

Zur weiteren Abreicherung von Verunreinigungen wurde die Mono Q-Säule mit 7 SV 20 mM Essigsäurepuffer gespült, der mit 0,1 N HCl auf pH 2,0 eingestellt worden war (Puffer VI).

Danach wurde die Säule mit 5-6 SV 20 mM Essigsäure, 20 mM NH<sub>4</sub>Cl-Puffer, pH 2,0 (mit 0,1 n HCl eingestellt, Puffer VII) weiter eluiert. Nach 1-2 SV eluierte eine bei 280 nm UV-aktive Bande, die Verunreinigungen enthielt, nach weiteren 1-2 SV eluierte das neue Protein. Eine weitere Menge reines Protein kann durch Nachelution mit 1-2 SV eines auf 100 mM NaCl eingestellten Puffers VII erreicht werden.

Das Protein wurde so in einer gelelektrophoretischen Reinheit von >90 % erhalten. Aus 1 l Urin lassen sich etwa 1 bis 10  $\mu$ g Protein erhalten.

#### Beispiel 3

##### Proteinisolierung aus menschlicher Ascitesflüssigkeit.

2,5 l leicht trübe, dünnflüssige Ascitesflüssigkeit, die als Punktat einer Patientin mit Ovarialcarcinom anfiel, wurde 30 min bei 3000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 10 %iger Phosphorsäure auf pH 7,2 eingestellt und über eine mit Glutardialdehyd vernetzte TNF-Sepharose®-Säule (vgl. Beispiel 4) gegeben. ( $\varnothing = 1,5$  cm,  $l = 3$  cm). Die Säule wurde mit 50 ml Puffer III äquilibriert und nach dem Auftrag mit 150 ml Puffer III nachgewa-

schen. Die TNF-bindenden Proteine wurden mit 30 ml Puffer IV eluiert.

Zur weiteren Reinigung wurde das Eluat mit 10%iger HCl auf pH 3,0 eingestellt und auf eine mit 20 mM Essigsäure (pH 3,0) äquilierte Chromatographiesäule (Mono S HR 5/5, Fa. Pharmacia) gegeben. Nach dem Auftrag wurde mit 10 ml 20 mM Essigsäure (pH 3,0) nachgewaschen und die TNF-bindenden Proteine anschließend durch Elution mit 4 ml eines Puffergemisches aus 6 Teilen 20 mM Essigsäure (pH 3,0) und 4 Teilen 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 9,0) eluiert. Der pH-Wert des Eluats wurde kontrolliert und gegebenenfalls auf pH 6,5 nachgestellt.

Das Eluat wurde über eine mit Natriumphosphatpuffer pH 6,0 (Puffer VIII) äquilierte Chromatographiesäule Mono Q HR 5/5 gegeben. Nach Waschen mit je 6 ml Puffer VIII und 6 ml 20 mM Essigsäure, 5 mM NaCl, pH 2,2 wurde das Protein mit 6 ml 20 mM Essigsäure, 150 mM NaCl, pH 2,0 (Puffer IX) von der Säule eluiert.

Die Charakterisierung des letzten Eluats ergab, daß es sich - abgesehen von der Inhomogenität der N-terminalen Sequenz - um das gleiche Protein handelt, welches gemäß Beispiel 2 erhalten wurde.

#### Beispiel 4

##### Herstellung der TNF-Affinitätssäule

###### a) Kopplung von TNF an BrCN-Sepharose

7,5 g BrCN-Sepharose® (Fa. Pharmacia) wurden in 30 ml Wasser aufgeschlemmt. Nach 30 min Quellzeit wurde die BrCN-Sepharose®-Gelsuspension zuerst mit 500 ml 1 mM HCl-Lösung und dann mit 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 M NaCl, pH 8,3, gewaschen.

136 mg TNF gelöst in 41 ml Puffer (0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 M NaCl, pH 8,3) wurden zu dieser Gelsuspension gegeben. Der Reaktionsansatz wurde 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt und die TNF-Sepharose® bei 3000 U/min abzentrifugiert. Das Gelmaterial wurde mit 40 ml Puffer gewaschen.

Aus der Proteinbestimmung der Überstände errechnet sich eine Kopplungsausbeute von >90 %.

Zur Blockierung der überschüssigen aktiven Gruppen der BrCN-Sepharose® wurde die Gelsuspension mit 40 ml Puffer (0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 M NaCl, 1 M Ethanolamin, pH 8,3) versetzt, anschließend 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt und das Ethanolamin dann mit 3 x 40 ml Puffer (0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 M NaCl, pH 8,3) ausgewaschen.

###### b) Vernetzung der TNF-Sepharose® mit Glutaraldehyd

20 ml nach a) hergestellter TNF-Sepharose®

Gelsuspension wurden zweimal mit 25 ml Puffer (20 mM Natriumphosphat, 140 mM NaCl, pH 8,0) gewaschen. Die Suspension wurde in 40 ml desselben Puffers aufgenommen und mit 1,6 ml 25 %iger Glutaraldehydlösung versetzt. Nach 1 h Schütteln bei Raumtemperatur wurde die Suspension abzentrifugiert und mit 25 ml Puffer (20 mM Natriumphosphat, 140 mM NaCl, 1 M Ethanolamin, pH 8,0) versetzt. Es wurde wieder 1 h geschüttelt und die TNF-Sepharose® Suspension anschließend in eine Chromatographiesäule (Ø = 1,5 cm, l = 10 cm) gefüllt.

Die Säule war nach Waschen mit 100 ml Puffer (20 mM Natriumphosphat, 140 mM NaCl, pH 7,2) und 50 ml 0,58 % Essigsäure + 140 mM NaCl für die Affinitätschromatographie einsetzbar.

#### Beispiel 5

##### Charakterisierung des Proteins

###### a) Molekulargewicht und Reinheit

Zur Bestimmung des Molekulargewichts und der Reinheit wurden 2 µg des nach Beispiel 2 bzw. 3 erhaltenen Proteins einer 15 % SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen unterworfen (Nature 227, 680 (1970)). Im Vergleich mit einer Reihe bekannter Eichproteine wurde das neue Protein nach beiden Methoden nach Färbung mit Coomassie blue als homogene Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 42.000 Dalton erkannt.

Andere Banden waren nicht zu erkennen. Die Reinheit des Proteins kann daher mit ≥90 % angegeben werden.

Das Protein gibt sich als deutlich blau-violett gefärbte Bande zu erkennen.

###### b) N-terminale Sequenzierung

10 µg (≈250 pMol) des nach Beispiel 2 erhaltenen Proteins wurden mit einem Gasphasensequenzer N-terminal mehrmals sequenziert.

Die N-terminale Sequenzanalyse deutet wegen des Auftretens verwandter Nebensequenzen auf die Inhomogenität der N-terminalen Aminosäuresequenz hin. Es wurden folgende Hauptsequenzen ermittelt:

###### Sequenz 1a

Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu

Nebenher konnte in der Gasphasensequenzierung eine um 6 Aminosäuren N-terminal verlängerte

###### Sequenz 2a

Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu

und eine um 1 Aminosäure N-terminal vermin-

derte

Sequenz 3a

Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys

Arg Leu Arg Glu

ermittelt werden.

Analog wurden in dem Protein gemäß Beispiel 3 folgender Hauptsequenzen ermittelt:

Sequenz 1b

Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu (etwa 10 %)

Sequenz 2b

Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu (etwa 45 %)

Sequenz 3b

Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu (etwa 45 %)

d) Behandlung mit Trypsin

20 µg der neuen Proteine wurden bei pH 8,5 wie folgt behandelt:

1. Zugabe von 0,5 µg Trypsin, gelöst in 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>-Puffer pH 8,5; Inkubation 16 h bei 37 °C

2. Zugabe von 0,5 µg Trypsin, gelöst in 0,1 % SDS - 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>-Puffer pH 8,5; Einstellen der Lösung auf 0,1 % SDS-Gehalt; Inkubation 16 h bei 37 °C.

Die so behandelten Proteine wurden in einer 15 %igen SDS-Polyacrylamidelektrophorese vergleichend mit dem Ausgangsprotein analysiert. Es konnte kein Abbau der Proteine festgestellt werden.

Beispiel 6

Deglykosylierung

0,1 ml des gemäß Beispiel 2 erhaltenen Mono Q-Eluats (~ 0,1 mg/ml Protein) wurden mit 1 M NaOH auf pH 7,2 eingestellt. Anschließend wurden 10 Units Glykopeptidase F (Fa. Boehringer Mannheim) zugesetzt. Nach 6 h Inkubation bei 37 °C wurden weitere 10 Units Enzym zugesetzt. Nach weiteren 16 h Reaktionszeit wurden 50 µl des Ansatzes lyophilisiert und in einem 15%igen SDS-Gel im Vergleich mit unbehandelten Protein analysiert. Das mit Enzym behandelte Protein zeigte ein im Vergleich zur unbehandelten Probe um etwa 3 kD vermindertes Molekulargewicht. Weitere 25 µl des Ansatzes wurden, wie in Beispiel 1 beschrieben, auf TNF $\alpha$  inhibierende Wirkung getestet. Die TNF $\alpha$ -inhibierende Wirkung blieb auch nach Abspaltung des Zuckeranteils voll erhalten.

Beispiel 7

Antikörperproduktion

Die in den Beispielen 2 und 3 isolierten Proteine wurden zur Produktion polyklonalter Antikörper in Kaninchen injiziert. Die Reaktivität und Spezifität der Antikörper überprüfte man mittels ELISA. Dazu wurden ELISA-Platten (Fa. Costar) mit einer Lösung von 1 µg Inhibitor- bzw. Kontrollprotein/ml 0,05 M Natriumcarbonatpuffer pH 9,6 beschichtet, die unspezifische Bindung mit 1 % BSA/PBS abgesättigt und mit verschiedenen Serumverdünnungen inkubiert. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte mit biotinyliertem anti-rabbit-IgG und Streptavidin-Peroxidase, sowie TMB-Substrat. Zwischen den einzelnen Inkubationen wurde je 3mal mit 0,05 % Tween-20/PBS gewaschen. Nach Abstoppen mit 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bestimmte man die optische Dichte bei 450 nm.

Beispiel 8

Proteinnachweis in Körperflüssigkeiten

Zum Nachweis von TNF $\alpha$  bindenden Proteinen in verschiedenen Körperflüssigkeiten diente ein sandwich-ELISA. Dazu wurden ELISA-Platten (Fa. Costar) mit TNF beschichtet (5 µg/ml 0,05 M Natriumcarbonatpuffer pH 9,6). Nach Absättigen mit 1 % BSA/PBS inkubierte man mit den zu untersuchenden Proben z.B. Synovialflüssigkeiten von Rheumatkern. Die Detektion erfolgte mit den unter Beispiel 7 beschriebenen anti-Inhibitor-Antikörpern und biotinyliertem anti-rabbit-IgG/Streptavidin-Peroxidase/TMB-Substrat. Zwischen den einzelnen Inkubationen wurde je 3mal mit 0,05 % Tween-20/PBS gewaschen. Die Extinktion bei 450 nm wurde nach Zugabe von 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bestimmt.

Patentansprüche

1. Proteine, welche in ihrer ursprünglich glykosylierten Form ein Molekulargewicht von etwa 42.000 Dalton besitzen und am N-Terminus die Aminosäuresequenz Xaa Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu aufweisen, worin Xaa ein Wasserstoffatom, einen Phenylalaninrest (Phe) oder die Aminosäuresequenzen Ala Phe, Val Ala Phe, Gln Val Ala Phe, Ala Gln Val Ala Phe, Pro Ala Gln Val Ala Phe oder Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe darstellt, und deren Muteine, die durch geeigneten Austausch, Deletion oder Addition von Aminosäuren oder Peptiden oder durch Variation des Glykosidrestes entstehen, ohne daß dadurch die Wirkung der Proteine stark nachläßt.

2. Proteine nach Anspruch 1 in deglykosylierter Form

3. Proteine nach Anspruch 1 oder 2 mit TNF alpha-inhibierender Wirkung.

4. Verwendung der Proteine gemäß Anspruch 1 bis 3 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Krankheiten, bei denen die Konzentration an TNF alpha in Körperflüssigkeiten erhöht ist.

5. Verwendung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Krankheit eine Allergie, Autoimmunkrankheit, Erkrankung des rheumatischen Formenkreises, Schocklunge, entzündliche Knochenerkrankung, Blutgerinnungsstörung oder Komplikation nach Transplantationen ist.

6. Verwendung der Proteine gemäß Anspruch 1 bis 3 zur Herstellung von Antikörpern.

7. Antikörper gegen TNF alpha-inhibierende Proteine gemäß Anspruch 1 bis 3, herstellbar durch Immunisierung von Kaninchen mit Proteinen gemäß Anspruch 1 bis 3.

8. Verwendung der Antikörper nach Anspruch 7 zum Nachweis von TNF alpha-bindenden Proteinen in Körperflüssigkeiten.

### Claims

1. A protein which in its originally glycosylated form has a molecular weight of about 42,000 daltons and has at the N terminus the amino acid sequence  
 Xaa Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu  
 where Xaa is hydrogen, a phenylalanine residue (Phe) or the amino acid sequences Ala Phe, Val Ala Phe, Gln Val Ala Phe, Ala Gln Val Ala Phe, Pro Ala Gln Val Ala Phe or Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe, and the muteins thereof produced by suitable exchange, deletion or addition of amino acids or peptides or by modification of the glycoside residue without the effect of the protein being greatly diminished thereby.

2. A protein as claimed in claim 1 in deglycosylated form.

3. A protein as claimed in claim 1 or 2 with TNF alpha-inhibiting action.

4. The use of a protein as claimed in claims 1 to 3 for producing drugs for treating diseases in which the concentration of TNF alpha in body fluids is elevated.

5. The use as claimed in claim 4, wherein the disease is an allergy, autoimmune disease, rheumatic disease, shock lung, inflammatory bone disease, disturbance of blood clotting or complication after transplantations.

6. The use of a protein as claimed in claims 1 to 3 for producing antibodies.

7. An antibody against TNF alpha-inhibiting proteins as claimed in claims 1 to 3, which can be produced by immunizing rabbits with proteins as claimed in claims 1 to 3.

8. The use of an antibody as claimed in claim 7 for detecting TNF alpha-binding proteins in body fluids.

### Revendications

1. Protéines qui, sous forme glycosylée initiale, ont une masse molaire d'environ 42 000 daltons, et présentent sur le N terminal la séquence d'amino-acides  
 Xaa Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu  
 dans laquelle X représente un atome d'hydrogène, un reste phénylalanine (Phe) ou les séquences d'aminoacides Ala Phe, Val Ala Phe, Gln Val Ala Phe, Ala Gln Val Ala Phe, Pro Ala Gln Val Ala Phe ou Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe, et leurs mutéines qui se forment par échange, suppression ou addition appropriés d'amino-acides ou de peptides ou par variation du reste glycoside sans que l'activité des protéines ne baisse fortement.

2. Protéines selon la revendication 1, sous forme déglycosylée.

3. Protéines selon la revendication 1 ou 2, ayant une activité d'inhibition de TNF  $\alpha$ .

4. Utilisation des protéines selon les revendications 1 à 3, pour la préparation de médicaments pour le traitement de maladies dans lesquelles la concentration en TNF  $\alpha$  dans les fluides corporels est élevée.

5. Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que la maladie est une allergie, une maladie auto-immune, une maladie de type rhumatisma, une atteinte des poumons, une

maladie osseuse inflammatoire, un trouble de la coagulation sanguine ou une complication après transplantation.

6. Utilisation des protéines selon les revendications 1 à 3, pour la préparation d'anticorps. 5
7. Anticorps des protéines inhibitrices de TNF  $\alpha$  selon les revendications 1 à 3, préparables par immunisation de lapins avec les protéines selon les revendications 1 à 3. 10
8. Utilisation des anticorps selon la revendication 7, pour la détection de protéines se liant à TNF  $\alpha$  dans les fluides corporels. 15

20

25

30

35

40

45

50

55